

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan penelitian yang menguji sesungguhnya (*True Experimental Research*). Eksperimen murni dengan variabel bebas pada terikat pada sampel kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, dimana subjek-subjek yang diteliti dalam kedua kelompok tersebut diambil secara acak. Jenis penelitian dalam kegiatan ini adalah eksperimen murni pengujian variabel bebas dan terikat dilakukan terhadap sampel kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, dimana subjek-subjek yang diteliti dalam kedua kelompok eksperimen murni sesungguhnya (*True Experimental Research*).

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan *The Posttest-Only Control Group Design*, yang merupakan modifikasi dari design *true experimental* yaitu dengan memperhatikan perlakuan (variabel independen) terhadap hasil (variabel dependen) (Sugiyono, 2013). Rancangan ini menggunakan beberapa variabel, yaitu:

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2013). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Enzim kitinase dari berbagai jenis isolat *Trichoderma* spp.

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi sebab akibat, karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2013). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya tetas telur *Meloidogyne incognita*. yang ditandai dengan tidak menetasnya telur *Meloidogyne incognita*.

3.2.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel independen terhadap dependen tidak dipengaruhi faktor luar yang tidak diteliti. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah aquadest steril.

3.2.4 Hubungan Antar Variabel

Hubungan antar dua variabel merupakan variabel bebas (Variabel pengaruh/*independent variabel*) dengan simbol X dan variabel terikat (variabel terpengaruh/ *dependent variabel*) dengan simbol Y. Adapun variabel X dalam penelitian ini yaitu enzim kitinase dari beberapa jenis isolat *Trichoderma* spp. dan variabel Y dari penelitian ini yaitu daya tetas telur *Meloidogyne incognita*.

3.2.5 Definisi Operasional Variabel

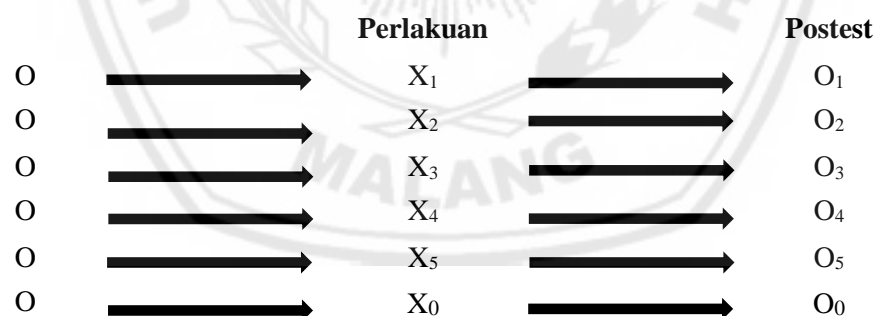
Agar tidak terjadi kesalahan makna dalam tiap variabel maka perlu didefinisikan tiap variabel yang digunakan dalam penelitian ini. Adapun operasional variabel tersebut, yaitu:

- a. Enzim kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin menjadi monomernya Nasetil-glukosamin. Kitinase dapat dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme dan mempunyai peran penting pada fisiologi dan ekologi. Semua enzim yang dapat mendegradasi kitin disebut sebagai kitinase total atau kitinase non spesifik (Herdyastuti, 2009).

- b. Daya tetas adalah persentase jumlah telur yang menetas dari jumlah telur yang fertil. Daya tetas telur merupakan salah satu indikator di dalam menentukan keberhasilan suatu penetasan.
- c. Telur nematoda yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 50-56 tiap petridish.
- d. Perubahan morfologi cangkang kulit telur akibat parasit enzim kitinase *Trichoderma* yang diamati di hari ke-3 setelah pengamatan jumlah telur.

Variabel bebas dan terikat akan dibandingkan dengan variabel kontrol agar dapat dilihat perbandingan antara perlakuan kontrol dengan perlakuan yang diberikan isolat kapang dengan jenis isolat *Trichoderma* yang terdiri dari T.4, T.6, T.PJ.18, T.ASB.17, T.18. Dalam desain ini terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara *random*. Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok yang lain tidak. Kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol (Sugiyono,2013).

Berikut tabel rancangan penelitian *True experimental* yang digunakan yaitu *The Posttest-Only Control Group Design*:



Tabel 3.1 Desain Percobaan Penelitian

Keterangan:

O = Telur *Meloidogyne incognita*

X1= Perlakuan dengan menggunakan isolat kapang *Trichoderma harzianum* (T.6)

X2= Perlakuan dengan menggunakan isolat kapang *Trichoderma harzianum* (T.ASB.17)

X3= Perlakuan dengan menggunakan isolat kapang *Trichoderma harzianum* (T.4)

X4 = Perlakuan dengan menggunakan isolat kapang *Trichoderma aurioviride* (T.18)

X5= Perlakuan dengan menggunakan isolat kapang *Trichoderma aurioviride* (T.PJ.18)

X₀ = Perlakuan menggunakan *aquadest* tanpa isolat kapang *Trichoderma* (Kontrol)

O₁ = Posttest menggunakan isolat kapang *Trichoderma harzianum* T.6 selama 72 jam

O₂= Posttest menggunakan isolat kapang *Trichoderma harzianum* T.ASB.17 selama 72 jam

O₃=Posttest menggunakan isolat kapang *Trichoderma harzianum* T.4 selama 72 jam

O₄= Posttest menggunakan isolat kapang *Trichoderma aurioviride* T.18 selama 72 jam

O₅= Posttest menggunakan isolat kapang *Trichoderma aurioviride* T.PJ.18 selama 72 jam

O₀= Posttest perlakuan dengan *aquadest* selama 72 jam

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap. Rancangan jenis ini memiliki ciri-ciri dimana penelitian yang dilakukan di lingkungan laboratorium dianggap homogen. Rancangan ini merupakan rancangan yang perlakuannya diletakkan dan dilakukan secara acak pada setiap percobaan, hal ini berarti seluruh unit percobaan memiliki peluang yang sama untuk menerima perlakuan. dalam suatu penelitian diperlukan suatu ulangan dalam perlakuan, hal ini dikarenakan dibutuhkan derajat ketelitian terhadap suatu penelitian. Menurut Sudjana (2002), jumlah ulangan dianggap cukup baik apabila memenuhi syarat berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan

r : Replikasi (jumlah ulangan)

t : Treatment (jumlah perlakuan)

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Dari hasil perhitungan diatas, didapatkan bahwa jumlah pengulangan yang diperlukan adalah sebanyak 4 kali. Denah Rancangan Acak Lengkap pada penelitian ini menggunakan 5 perlakuan yang masing-masing diulang 4 kali. Berdasarkan hasil perhitungan diatas rancangan “*The Posttest-Only Control Group Designed*” disusun design Rancangan Acak Lengkap sebagai berikut :

Banyak unit eksperimen pada petak RAL

= Banyak perlakuan x Ulangan

= 5 x 4

= 20 unit

Ragam unit eksperimen :

$X_1 \rightarrow X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}$

$X_2 \rightarrow X_{22}, X_{23}, X_{24}, X_{21}$

$X_3 \rightarrow X_{33}, X_{34}, X_{31}, X_{32}$

$X_4 \rightarrow X_{44}, X_{43}, X_{42}, X_{41}$

$X_5 \rightarrow X_{54}, X_{53}, X_{52}, X_{51}$

Penempatan setiap unit eksperimen dilakukan dengan melakukan pengundian dengan hasil berikut:

Tabel 3.2 Denah Rancangan Acak Lengkap

X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₁
X ₂₂	X ₂₁	X ₃₁	X ₄₂
X ₄₄	X ₃₃	X ₂₃	X ₅₄
X ₃₅	X ₄₁	X ₄₅	X ₅₂
X ₅₃	X ₃₂	X ₅₁	X ₂₄

3.2.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian mulai dilaksanakan pada tanggal 24 Oktober 2016 sampai 2 April 2017. Tempat penelitian pada Laboratorium Fitopatologi Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (BALITTAS) di Jl.Karangploso KM.4, Malang.



Gambar 3.1 Peta lokasi penelitian Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (BALITTAS) di Jl.Karangploso KM.4, Malang

3.2.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan *The Posttest-Only Control Group Design*, yang merupakan modifikasi dari design *true experimental* yaitu dengan memperhatikan kemungkinan adanya variabel moderator yang mempengaruhi perlakuan (variabel independen) terhadap hasil (variabel dependen) (Sugiyono, 2013). Tahap penelitian ini menggunakan beberapa tahapan dari pengambilan sampel, pengumpulan data

3.3 Populasi dan Teknik Sampling

3.3.1 Populasi

Menurut Gunawan (2013), populasi adalah keseluruhan objek penelitian, baik hasil menghitung maupun pengukuran (kuantitatif atau kualitatif) dari karakteristik tertentu yang akan dikenai generalisasi. Populasi dalam penelitian ini adalah telur nematoda puru akar (*Meloidogyne incognita*), yang diperoleh dari Laboratorium Fitopatologi BALITTAS (Balai Penelitian Tanaman Serat Dan Pemanis).

3.3.2 Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling*, yaitu cara pengambilan sampel dari anggota populasi dengan menggunakan acak tanpa memperhatikan strata (tingkatan) dalam anggota populasi tersebut. Sampel adalah bagian dari populasi yang memiliki karakteristik atau keadaan tertentu yang akan diteliti. Sampel dalam penelitian ini adalah telur *Meloidogyne incognita*, yang sudah di rontokkan dengan cara kocok selama 4 menit dengan larutan NaOCl 1%.

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dibagi menjadi 3 tahap, yaitu: tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap pengamatan

3.4.1 Persiapan Penelitian

Alat : Alat dan bahan berupa autoklaf, mikroskop cahaya, mikroskop *compound* tipe BX53, cawan petri, petrdisk kecil, rak tabung reaksi, bunsen, erlenmeyer 500 ml dan 50 ml, inkubator, *macrowave*, pipet tetes, mikropipet, magnetik stirrer, shaker, LAF (*Laminar Air Flow*) botol *scott*, blender, spatula, spet, kompor, timbangan, tabung reaksi, jarum ose, saringan kasar, saringan membran ukuran 0,120 μ , saringan halus, kertas label.

Bahan : Akar tomat yang telah terinfeksi *Meloidogyne incognita*, isolat kapang *T. harzianum* (T.ASB.17, T.4 dan T.6), *T. aurioviride* (T.PJ.18 dan T.18). media PDA, media PDB, larutan NaOCl 1%, media kitin, safranin, aquadest steril, tisu, plastic wreb, alumunium foil, alcohol.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Sterilisasi Alat

Mencuci semua alat dengan sabun hingga bersih kemudian dikeringkan. Membungkus semua peralatan dengan kertas sampul dan mensterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 menit.

b. Pembuatan PDA (*Potato Dextroxe Agar*)

1) Menimbang bubuk PDA

$$24 \text{ cawan petri} = 24 \times 36 = 864 \text{ ml}$$

$$1 \text{ liter} = 39 \text{ gram}$$

- 2) Merebus PDA sampai mendidih kurang lebih 15 menit sambil di aduk-aduk agar homogen.
- 3) Menyaring PDA kemudian memasukkan PDA ke tabung *scott* sebanyak 300 ml.
- 4) Mendinginkan hasil larutan PDA dalam suhu ruangan.
- 5) Mensterilkan PDA di dalam autoklaf.

c. Pembiakan Kapang *Trichoderma* spp.

1. Persiapan LAF dengan menyemprot LAF dengan alkohol kemudian di bersihkan.
2. Menyiapkan indukan isolat *Trichoderma* spp. bunsen, tisu, kertas label, cawan petri steril, media PDA, dan plastic wreb.
3. Plating media PDA di cawan petri, tunggu sampai memadat.
4. Menyeprot tangan sebelum masuk LAF, kemudian menyemprot jarum ose dengan alcohol dan di bakar di bunsen hingga panas memerah.
5. Mengambil spora dari indukan *Trichoderma* spp. kemudian di inokulasi pada media PDA.
6. Kemudian di tutup dengan plastic wreb, dan diberi label.

d. Pengambilan Telur Nematoda puru akar (*Meloidogyne incognita*).

1. Mencari akar tomat yang telah diinfeksi dengan *Meloidogyne incognita*.
2. Merendam akar tomat dan dicuci bersih
3. Memotong akar tomat menjadi bagian yang kecil-kecil
4. Akar yang sudah dipotong-potong di blender kemudian disaring, akar yang tertinggal di beri larutan NaOCl 1% dikocok selama 4 menit di dalam botol *scott*.
5. Menyaring dengan saringan kasar dan saringan halus.
6. Hasil dari saringan tersebut di endapkan selama 2 jam kemudian di ambil 5 ml untuk di amati dibawah mikroskop.

7. Kemudian diencerkan sampai mendapat ± 50 telur per petri.

e. Inokulasi Kapang *Trichoderma* spp.

1. Setelah peremajaan kapang yang telah tumbuh di masukkan ke dalam LAF
2. Menyiapkan media PDB yang sudah steril
3. Mengambil biakan kapang menggunakan jarum ose.
4. Memasukkan kapang yang telah di ambil kedalam tabung erlenmeyer yang berisi media PDB.
5. Menutup erlenmeyer menggunakan alumunium foil dan plastic wreb
6. Memberi label pada setiap tabung erlenmeyer.
7. Memasukkan tabung erlenmeyer kedalam alat *shaker*.
8. Mengatur waktu 7 hari dengan putaran 100 rpm dengan suhu 25-30°C

f. Perlakuan Kapang *Trichoderma* spp. Terhadap Nematoda Puru Akar

1. Mengambil biakan Kapang *Trichoderma* spp dari media PDB masukann ke dalam LAF.
2. Memasukkan Kapang *Trichoderma* spp yang ada dalam media PDB kedalam tube centrifuge untuk kemudian di centrifuge selama 15menit dengan kecepatan putaran 5400 rpm.
3. Menyiapkan telur nemato yang telah diletakkan di petridisk kecil, spet, label, plastic wreb, saringan membrane ukuran 0,120 μ , kemudian masukkan kedalam *Laminar Air Flow* (LAF).
4. Memasukkan Kapang *Trichoderma* spp sebanyak 5ml kedalam petridisk yang berisi telur nematoda.
5. Memberi label pada setiap petridisk yang telah berisi nematodan dan *Trichoderma* spp.

6. Menyimpan isolat yang sudah terinfeksi Kapang *Trichoderma* kedalam incubator dengan suhu 25°C
7. Mengamati setiap 1 hari sekali untuk melihat jumlah telur *Meloidogyne incognita* yang tidak menetas.
8. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *compound* tipe BX53 dengan perbesaran 20x10.

g. Pembuatan Media Kitin

- 1) Menyiapkan bahan-bahan yang digunakan untuk media kitin
- 2) Menimbang koloidal kitin sebanyak 0,5 gram
- 3) Menimbang MgSO_4 sebanyak 1,2 gram
- 4) Menimbang K_2HPO_4 sebanyak 0,5 gram
- 5) Menimbang KCl sebanyak 1 gram
- 6) Menimbang $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,01 gram
- 7) Menimbang ZnSO_4 sebanyak 0,001 gram
- 8) Menimbang MnCl_2 sebanyak 0,001 gram
- 9) Menimbang agar sebanyak 12-15 gram
- 10) Menyiapkan aquadest sebanyak 1 liter
- 11) Menuangkan semua bahan kedalam panci berisi aquadest dan mengaduknya sampai mendidih
- 12) Menyaring media dengan kain saring dan meletakkannya ke dalam wadah.

h. Uji Kitinase Isolat *Trichoderma* Pada Media Kitin

1. Menimbang bahan-bahan untuk media kitin
2. Merebus bahan-bahan tersebut dengan 1 liter air *aquadest* sampai mendidih.

3. Menyaring dengan kain saring.
4. Memasukkan kedalam 3 tabung erlenmeyer masing-masing sebanyak 300 ml.
5. Mensterilkan media kitin didalam *autoclave*.
6. Mencairkan media kitin didalam *waterbath*.
7. Menyiapkan LAF untuk plating media dan penanaman Kapang *Trichoderma* spp.
8. Meneteskan pewarna safranin pada media sambil mengocok perlahan media agar tidak beku dan cepat dingin.
9. Menuang media kedalam petridisk masing-masing 10ml.
10. Menunggu media didalam petridisk mengeras.
11. Menanam Kapang *Trichoderma* spp. kedalam petridisk menggunakan jarum ose.
12. Mensterilkan dengan dipanaskan di Bunsen
13. Menutup petridisk dengan *plastik wrap*.
14. Diamati pada hari ke-3, jika muncul zona bening dan warna media yang merah terdegradasi maka dapat disimpulkan jamur *Trichoderma* spp. menghasilkan enzim kitinase yang dapat mendegradasi kitin pada cangkang telur nematoda puru akar (*Meloidogyne incognita*).

i. Penyusunan Sumber Belajar *Booklet*

Pemanfaatan sumber belajar cetak berupa *booklet*. Secara sistematis Pemanfaatan sumber belajar cetak *booklet* dilakukan sebagaimana diuraikan sebagai berikut:

- a) Menganalisis kurikulum untuk menentukan pokok bahasan
 - b) Menentukan KI/KD yang sesuai dengan materi yang akan dibuat sebagai sumber belajar.
- Materi yang akan disusun sebagai sumber belajar adalah materi ciri-ciri dan peranan Eubacteria.

- c) Menentukan judul *booklet* yang disesuaikan dengan kompetensi dasar serta materi pokok yang akan dicapai oleh peserta didik.
- d) Penyajian kalimat singkat dan jelas.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data pada penelitian ini dengan cara pengamatan yang dilakukan setiap dengan menggunakan alat bantu mikroskop yang kemudian datanya akan dimasukkan kedalam table. Observasi di laboratorium ini difokuskan pada obyek perlakuan yaitu variabel terikat yang diberi perlakuan, kemudian data yang diperoleh diaplikasikan ke dalam bentuk tabel. Tabel tersebut akan mencakup data dalam bentuk angka yang diamati setiap satu hari selama 3 hari kemudian diambil rerata perhitungan jumlah telur *Meloidogyne incognita*. yang tidak meneta observasi perhitungan daya hambat penetasan telur *Meloidogyne* spp. ditunjukkan pada tabel berikut :

Tabel 3.3 Tabel Data Daya Hambat Isolat *Trichoderma* spp. Terhadap Penetasan Telur *Meloidogyne incognita*

Perlakuan	Pengulangan	Jam				rata-rata
		24	48	72	uji kitin	
	1					
	2					
	3					
	4					
Kontrol						

8)

3.6 Teknik Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis kuantitatif, dimana pengolahan data dilakukan menggunakan uji normalitas (Liliefors), uji homogenitas, dianalisis dengan One Way

Anova dan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikasi $\alpha=0,05$.

Metode pemanfaatan sumber belajar pada penelitian ini adalah *booklet* dengan sasaran siswa SMA kelas X. *Booklet* ini berupa ringkasan materi tentang ciri-ciri dan peranan fungi, khususnya peranan *Trichoderma* spp. sebagai pengendali hayati penyakit puru akar yang disebabkan oleh nematoda *Meloidogyne incognita*.

